

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 5 月 6 日 (06.05.2004)

PCT

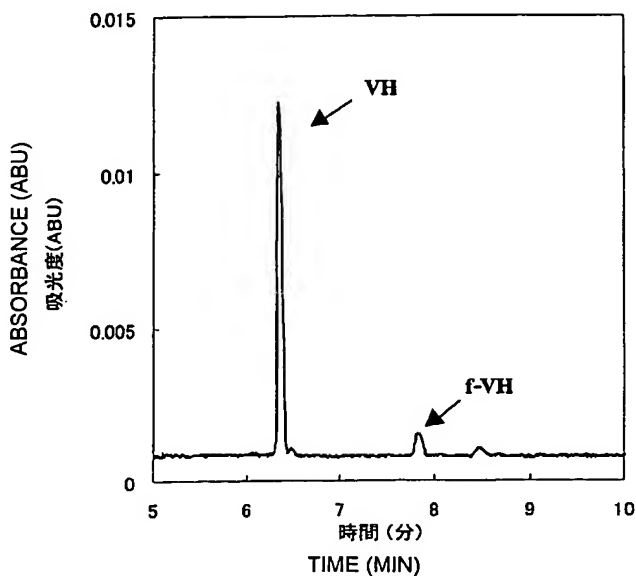
(10) 国際公開番号  
WO 2004/038033 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12P 21/02, (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013547
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2002-308731  
2002 年 10 月 23 日 (23.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 海老沼 宏幸 (EBINUMA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒301-0852 茨城県龍ヶ崎市向陽台 3 丁目 3 番 1 号 第一化学薬品株式会社 診断薬研究所内 Ibaraki (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: DEFRUCTOSYLATION METHOD

(54) 発明の名称: 脱フルクトシル化方法



(57) Abstract: A plant-origin defructosylation enzyme, a method of defructosylating a fructosylated peptide or protein using the enzyme, and a method of measuring a fructosylated peptide and protein.

(57) 要約: 本発明は、植物由来の脱フルクトシル化酵素、これを用いたフルクトシル化ペプチド又はタンパク質からの脱フルクトシル化方法、及びフルクトシル化ペプチド及びタンパク質の測定方法に関する。

Rec'd PCT/PTO 14 APR 2005

WO 2004/038033 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 脱フルクトシル化方法

## 技術分野

本発明は、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質から、酵素により脱フルクトシル化する方法及びその作用を有する新規酵素、並びに該方法により得られた反応生成物を測定することによる、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法に関する。

## 背景技術

ヘモグロビン (Hb) A1c は、そのβ鎖N末端バリンのアミノ基とグルコースのアルデヒド基が、非酵素的にシッフ塩基を形成した後、アマドリ転移を生じて安定化したアマドリ転移生成物であり、結果的にバリン残基にフルクトースが結合した構造を有する糖化タンパク質である。かかるHb A1c は、臨床的に過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映することから、糖尿病管理の指標として重要であり、迅速、簡便かつ正確で実用的な定量法が求められている。

I F C C (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) は、ヘモグロビンをエンドプロテアーゼGlu-Cにより加水分解して得られる、フルクトシルバリンの存在が疑われるβ鎖N末端の6ペプチドフラグメントをHPLCにより分離した後、キャピラリー電気泳動法又は質量分析法で定量する方法をHb A1cの実用基準法 (Kobold U., et al ; Candidate reference methods for hemoglobinA1c based on peptide mapping. Clin. Chem., 43, 1944-1951 (1997)) としているが、この方法は、特別な装置を必要とするため、操作が煩雑で経済性が悪く、実用には不向きな方法である。

現在、実用に供されているHb A1cの測定方法は、疎水基あるいは陽イオン

交換基をもった特殊な硬質ゲルを担体として使用するHPLC法や抗HbA1c抗体を使用するラテックス免疫凝集法などであるが、高価な機器を必要としたり、多段階の免疫反応を必要とするなど、迅速性、簡便性、正確性を必ずしも満足する方法ではなかった。

近年、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解し、糖化アミノ酸に作用するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOD）などの酵素を使用して、HbA1cやグリコアルブミンなどの糖化タンパク質を酵素法により測定しようとする方法が報告されている（特開平5-192193号、特開平7-289253号、特開平8-154672号、特開平6-046846号、特開平8-336386号、WO97/13872、WO02/06519、特開2001-054398号）。

これらの方法は、糖化タンパク質がHbA1c及びグリコアルブミンのいずれの場合であっても、FAODなどの酵素が、糖化タンパク質のままでは作用することが困難であるため、それぞれの糖化タンパク質に特徴的な糖化アミノ酸（HbA1cにおけるフルクトシルバリン、グリコアルブミンにおけるフルクトシルリジン）を糖化ペプチドあるいは糖化タンパク質より切り出して、FAODなどの基質とする方法である。したがって、FAODなどの基質となりうるように糖化アミノ酸を効率的に切り出す必要がある。

上記の目的のため、糖化タンパク質から糖化アミノ酸を効率的に切り出すプロテアーゼの探索が試みられ、多数のプロテアーゼが報告されているが、これらが実際に、糖化アミノ酸あるいは糖化アミノ酸を含むペプチドをどのように糖化タンパク質から切り出しているか、例えば、糖化タンパク質から、どのような長さのペプチド鎖が切り出されているかについては記載がなく、その意味から、前記記載が実用的なものであるか否かは不明であった。

一方、試料をプロテアーゼ処理し、遊離した糖化ペプチドに、糖化ペプチドオキシダーゼを作用させて、糖化タンパク質を測定しようとする方法が報告されて

いる（特開 2001-095598 号）。しかしながら、この方法に使用されている糖化ペプチドオキシダーゼは、実質的には、フルクトシルジペプチドに対して作用するものであり、ジペプチドよりも長いフルクトシルペプチドに対しては有効でなく、従来の FAOD などを使用する場合と同様、基質となりうるフルクトシルジペプチドを効率よく切り出す必要があるという課題が残っていた。

また、FAOD を他の酵素と組み合わせて使用した報告もある（特開 2000-333696 号）。しかし、この方法は、プロテアーゼで切り出した糖化アミノ酸に FAOD を作用させた時に発生する過酸化水素と、同時に生成する糖化アミノ酸分解産物であるグルコソンにグルコースオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素の両方の過酸化水素を測定することによって、測定感度を向上させるものであり、長さの異なる糖化ペプチドについて、脱フルクトシル化を図るものではない。

#### 発明の開示

したがって、本発明の目的は、HbA1c 等のフルクトシル化タンパク質や当該フルクトシル化タンパク質をプロテアーゼにより分解させた時に切り出される種々の長さのフルクトシル化されたペプチドに対して、脱フルクトシル作用を有する酵素、当該酵素を用いた脱フルクトシル化方法及び当該脱フルクトシル化反応を利用したフルクトシル化されたペプチド又はタンパク質の測定方法を提供することにある。

本発明者らは、上記目的を達成すべく、酵素を自然界から探索した結果、今まで報告されている FAOD などの脱フルクトシル作用を有する酵素が微生物由来であったのに対して、バラ科、ブドウ科、セリ科等の植物中にも脱フルクトシル作用を有する酵素が存在し、かつ当該植物由来の酵素は、フルクトシルペプチドのペプチド鎖の長さに係わらず脱フルクトシル作用を発揮することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に、植物から抽出された脱フルクトシル作用を有する酵素を作用させることを特徴とする脱フルクトシル化方法を提供するものである。

また本発明は、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、植物由来である酵素を提供するものである。

さらに本発明は、前記の脱フルクトシル化方法により得られた反応生成物の1種又は2種以上を測定することを特徴とするフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法を提供するものである。

本発明の脱フルクトシル化酵素により、N末端のバリンがフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質から脱フルクトシル化することができる。さらに、反応生成物を定量することによって、N末端のバリンがフルクトシル化されているペプチド、タンパク質、タンパク質のサブユニット等、例えばHb A1c等が正確に定量できる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルジペプチド(f-VH)に作用させた反応液1のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図2は、精製水をフルクトシルジペプチド(f-VH)に作用させた対照液1のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図3は、バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルトリペプチド(f-VHL)に作用させた反応液2のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図4は、精製水をフルクトシルトリペプチド(f-VHL)に作用させた対照液2のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図5は、バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルテトラペプチド（f-VHLT）に作用させた反応液3のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図6は、精製水をフルクトシルテトラペプチド（f-VHLT）に作用させた対照液3のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図7は、バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルペンタペプチド（f-VHLTP）に作用させた反応液4のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図8は、精製水をフルクトシルペンタペプチド（f-VHLTP）に作用させた対照液4のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図9は、バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルヘキサペプチド（f-VHLTPE）に作用させた反応液5のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図10は、精製水をフルクトシルヘキサペプチド（f-VHLTPE）に作用させた対照液5のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図11は、ブドウ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルジペプチド（f-VH）に作用させた反応液6のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図12は、精製水をフルクトシルジペプチド（f-VH）に作用させた対照液6のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

図13は、セリ科植物由来脱フルクトシル化酵素をフルクトシルジペプチド（f-VH）に作用させた反応液7のキャピラリー電気泳動結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において「脱フルクトシル」とは、フルクトシルアミノ酸又はフルク

トシルペプチド（即ち、フルクトシル化されているアミノ酸又はペプチド）から、フルクトシル部分が酸化分解や加水分解等を起こし、その結果、フルクトシル化されていないアミノ酸又はペプチドを生成することを意味する。

本発明に用いられる酵素（「脱フルクトシル化酵素」という）としては、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であれば、特に制限されないが、様々な長さのフルクトシルペプチドに作用することから、植物由来の脱フルクトシル化酵素が好ましい。さらに、本発明酵素が含まれている植物としては、特に制限はないが、バラ科、ブドウ科又はセリ科に属する植物が、特に好ましい。バラ科に属する植物としては、林檎、梨、桃、梅などが挙げられる。ブドウ科に属する植物としては、葡萄、蔦などが挙げられる。セリ科に属する植物としては、人参、セリ、三つ葉などが挙げられる。また、本発明酵素の植物からの抽出に際しては、脱フルクトシル化酵素が含まれている部位であれば特に制限されず、果実、葉、茎、花、根茎、根などの部位が利用できる。また、これらの植物の加工品、例えば、抽出液のジュースや凍結乾燥製剤なども利用できる。

上記植物から、脱フルクトシル化酵素を抽出する方法としては、上記植物を直接破碎して、圧搾等の処理により抽出液を得ることもできるが、適当な緩衝液等を加えてから破碎し、抽出することもできる。本発明においては、抽出液を用いることも可能であるが、精製した方がより好ましい。精製方法としては、公知の方法が利用でき、硫安分画やイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトゲル、ゲル濾過等のカラムクロマトグラフィーを適宜組み合わせて使用することが出来る。また、植物抽出液中のポリフェノールの影響を除く為に、還元剤の添加や高分子吸収体での処理などを組み合わせることも可能である。

本発明の脱フルクトシル化酵素によれば、例えば糖化タンパク質をプロテアー



ぜ分解した際に、様々な長さのフルクトシルペプチドが生成されたとしても、本発明酵素はこれらのすべてに作用する為、細断するための別のプロテアーゼの追加や処理時間を費やすことがなくなり、糖化タンパク質測定の効率化が図れる。また、臨床検査だけでなく、医療など様々な分野に応用が可能である。尚、本発明の脱フルクトシル化酵素は、基質であるフルクトシルペプチドから脱フルクトシル化する際に、FAODのように酸化分解を行い、過酸化水素やグルコソン等を発生させる作用を有していてもよい。この作用を有している場合は、生成する過酸化水素を、公知のペルオキシダーゼ等を用いた酵素的測定系に導けるので、特に好ましい。また、フルクトシルペプチドを加水分解による脱フルクトシル化作用を有する酵素も利用することができ、この作用で生成するグルコースを、グルコースオキシダーゼ等を用いて測定することも可能である。

本発明の脱フルクトシル化方法に用いるフルクトシル化ペプチド又はフルクトシル化タンパク質は、脱フルクトシル化酵素が作用するものであれば特に制限されないが、ヘモグロビンの $\beta$ 鎖N末端バリンがフルクトシル化されているフルクトシルペプチド及びHb A1cであることが特に好ましい。また、N末端のバリンがフルクトシル化されているペプチドとしては、アミノ酸数には限定されないが、そのアミノ酸配列が配列番号1～5で表されるものが特に好ましい。

上記N末端のバリンがフルクトシル化されているペプチドは、かかる配列を有するペプチド又はタンパク質、例えばHb A1cを、適当なエンドプロテアーゼ又はエキソプロテアーゼ等を用いて処理することにより、調製することができる。これらプロテアーゼとしては、例えばエラスターゼ、プロテイナーゼK、ペプシン、アルカリプロテアーゼ、トリプシン、プロリン特異エンドプロテアーゼ、V8プロテアーゼ、カルボキシペプチダーゼA、カルボキシペプチダーゼB等が挙げられる。上記調製のためのこれらプロテアーゼの活性量としては、0.05～10000 U/mL、特に10～2000 U/mLが好ましい。

フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に、本発明の脱フルクトシ

ル化酵素を作用させる条件のうち処理温度は、20～50℃、特に30～40℃が好ましい。また、処理時間は、3分～100時間、特に5分～20時間が好ましい。かかる処理により、グルコソンやグルコース及び脱フルクトシルペプチドを含む反応生成物を得ることができる。従って、当該生成物の1種又は2種以上を測定すれば、フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質を測定することができる。

また、本発明の脱フルクトシル化酵素活性の確認並びにフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法としては、生成した脱フルクトシルペプチドを、HPLCやキャピラリー電気泳動により分離同定することによって検出してもよいが、脱フルクトシルペプチドに適当なカルボキシペプチダーゼを作用させ、遊離してくるアミノ酸を検出、測定してもよい。例えば、N末端のバリンがフルクトシル化された配列番号5のペプチドを使用した場合には、カルボキシペプチダーゼの作用により、グルタミン酸 (G l u)、プロリン (P r o)、スレオニン (T h r)、ロイシン (L e u)、ヒスチジン (H i s)、バリン (V a l) を生成させることが出来るが、その中で、G l uはグルタミン酸脱水素酵素、L e uはロイシン脱水素酵素、V a lはバリン脱水素酵素を用いて、NADH又はNADPHの生成量を測定することによって検出、測定することも可能である。さらに、脱フルクトシル化により生成するグルコソンやグルコースに関しては、グルコースオキシダーゼ等を使用して、発生する過酸化水素を、ペルオキシダーゼ発色系を用いて、検出、測定することが出来る。その一例としては、以下の様な方法が挙げられる。

#### ~~2.2.2~~ 反応生成物の測定)

基質であるフルクトシルペプチドに本発明酵素を作用させ、一定時間加温した反応液300  $\mu$ Lに、予め用意した、200 mM酢酸緩衝液 (pH6.0) 750  $\mu$ L、4000 u/mLグルコースオキシダーゼ (東洋紡社) 450  $\mu$ L、0.15% 4-アミノアンチピリン300  $\mu$ L、0.3% T O O S (同仁化学

社) 300  $\mu$ L、500 u/mL パーオキシダーゼ (東洋紡社, Type III) 300  $\mu$ L 及び 1% アジ化ナトリウム 300  $\mu$ L を混和した液を加え、37°C で 10 分間加温後、550 nm における吸光度を測定する。基質の代わりに精製水を加える以外は、上記と同様の操作を行い対照とする。生成色素量の酵素反応生成物 (グルコソンやグルコース) 量への換算は、グルコースの希釈系列を基質とし、本発明酵素の代わりに精製水を加えて上記操作を行い作成した検量線より行う。また、脱フルクトシル反応の際に、過酸化水素が生成する脱フルクトシル化酵素を用いた場合は、直接生成した過酸化水素を、公知のペルオキシダーゼ発色系を用いて、検出、測定することも可能である。

ペルオキシダーゼ (POD) 発色系は、特に制限はないが、反応系に色原体及び POD を添加し、該色原体を酸化して発色物質を生成させ、これを測定する方法が好適である。この色原体としては、4-アミノアンチピリンと、フェノール系化合物、ナフトール化合物又はアニリン系化合物との組み合わせ、MBTH (3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン) とアニリン系化合物との組み合わせ、ロイコメチレンブルー等が用いられる。また、特許第 2516381 号に記載されているように、POD 存在下にて過酸化水素と 2 価のコバルトイオンとの反応により生じた 3 価のコバルトイオンを、3 価のコバルトイオンに特異的な指示薬、例えば TASBB (2-(2-チアゾリルアゾ)-5-ジスルフォブチルアミノ安息香酸三ナトリウム塩) と組み合わせ、発色キレート化合物を生成させ、これを測定する方法も利用できる。これによれば、上記方法の 5~10 倍の測定感度を得ることができる。また、過酸化水素を検出する試薬として、高感度に測定可能な TPM-PS (N, N, N', N', N'', N''-ヘキサ (3-スルフォプロピル)-4, 4', 4''-トリアミノトリフェニルメタン) (同仁化学社製) 等も利用できる。

本発明方法を用いれば、N 末端のバリンがフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質、例えば Hb A1c を極めて高精度で定量することができる。こ

ここでHbA1cの定量に使用される被験試料としては、例えば全血、赤血球等が挙げられる。

## 実施例

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

### 実施例 1

#### バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

梨の表皮及び種子周辺を除いた果肉部分100g当り、300mM塩化ナトリウムを含む100mM酢酸ナトリウム(pH4.5)を100mL加え、直接ミキサーにて破碎した後、遠心分離により固形物を除去し、粗抽出液を得た。この粗抽出液に、PVP(ポリビニルピロリドン：ナカライテスク社製)を2%分添加し、室温で30分攪拌した。その後、遠心分離によりPVPを除去し処理液を得た。これを粗精製酵素とした。

### 実施例 2

#### ブドウ科植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

ブドウの表皮を除いて、果肉部分をミキサーで破碎した後、遠心分離により固形物を除去し、抽出液を得た。これを粗精製酵素とした。

### 実施例 3

#### セリ科植物由来脱フルクトシル化酵素の調製

人参の根茎部分を、直接ジューサーにて破碎した後、遠心分離により固形物を除去し、粗抽出液を得た。この粗抽出液を、マイレックスフィルター(0.45  $\mu$ m)(ミリポア社製)を用いて濾過を行い、澄明な抽出液を得た。この抽出液3mLに対して、冷エタノールを4mL添加し、生じた沈殿を遠心分離によって除いた。得られた上清に、さらに冷エタノールを添加し、生じた沈殿を遠心分離により得た。得られた沈殿に、少量の20mMリン酸緩衝液(pH7.0)を加

えて溶解させ、これを粗精製酵素とした。

#### 実施例 4

##### フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

(バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素の使用)

(i) 100mM酢酸緩衝液 (pH 6.0) 100  $\mu$ L に、配列番号 1～5 で表されるアミノ酸配列を有する N 末端のバリンがフルクトシル化されているペプチド (f-VH～f-VHL TPE : バイオクエスト社製) の各 500  $\mu$ M 水溶液 40  $\mu$ L、精製水 20  $\mu$ L および実施例 1 で得られた梨由来の粗精製酵素の溶液 40  $\mu$ L を加え、混和後、37℃で 64 時間反応させた。この反応液を、分子量 10000 の限外濾過を行い、濾液を分取した (反応液 1～5)。この反応液 1～5 を、キャピラリー電気泳動装置 CAPI-3200 (大塚電子社製) にて、泳動緩衝液 : 150mM リン酸緩衝液 (pH 2.0)、電圧 : 15 kV、検出波長 : 210 nm の条件で分析を行い、ピーク位置およびピーク面積を測定した。

##### (ii) 対照試験

対照として、粗精製酵素溶液の代わりに、精製水を加え、同じ条件にて反応させ濾液を得た (対照液 1～5)。この対照液 1～5 の分析結果を反応液 1～5 の結果と比較した。

尚、酵素反応及び対照試験に用いた各フルクトシルペプチドには、非フルクトシルペプチドが含まれており、2 種のピークの変化で、酵素活性の有無を検出した。

反応液 1 の結果を図 1 に、対照液 1 の結果を図 2 に示した。図 2 では、f-VH に由来するピーク (面積 : 13mABU $\times$ sec) 及び VH に由来するピーク (面積 : 34mABU $\times$ sec) が認められているが、図 1 では、f-VH のピークが減少 (面積 : 4mABU $\times$ sec) し、VH のピークが増加 (面積 : 38mABU $\times$ sec) しているのが確認された。

反応液 2 の結果を図 3 に、対照液 2 の結果を図 4 に示した。図 4 では、f-V

VHLに由来するピーク（面積：32mABU×sec）及びVHLに由来するピーク（面積：22mABU×sec）が認められているが、図3では、f-VHLのピークが減少（面積：7mABU×sec）し、VHLのピークが増加（面積：34mABU×sec）しているのが確認された。

反応液3の結果を図5に、対照液3の結果を図6に示した。図6では、f-VHL Tに由来するピーク（面積：38mABU×sec）及びVHL Tに由来するピーク（面積：20mABU×sec）が認められているが、図5では、f-VHL Tのピークが減少（面積：5mABU×sec）し、VHL Tのピークが増加（面積：32mABU×sec）しているのが確認された。

反応液4の結果を図7に、対照液4の結果を図8に示した。図8では、f-VHL TPに由来するピーク（面積：64mABU×sec）及びVHL TPに由来するピーク（面積：23mABU×sec）が認められているが、図7では、f-VHL TPのピークが減少（面積：8mABU×sec）し、VHL TPのピークが増加（面積：57mABU×sec）しているのが確認された。

反応液5の結果を図9に、対照液5の結果を図10に示した。図10では、f-VHL TPEに由来するピーク（面積：54mABU×sec）及びVHL TPEに由来するピーク（面積：21mABU×sec）が認められているが、図9では、f-VHL TPEのピークが減少（面積：9mABU×sec）し、VHL TPEのピークが増加（面積：48mABU×sec）しているのが確認された。

これらの結果から、バラ科植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。

#### 実施例5

##### フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

（ブドウ科植物由来脱フルクトシル化酵素の使用）

実施例2で得られた粗精製酵素についても、実施例4と同様の条件下で試験を

行った。但し、N末端のバリンがフルクトシル化されているペプチドは、VHを含まないf-VHを使用し、反応時間は37℃で16時間とした（反応液6）。また、対照試験は、実施例4に準じて行った（対照液6）。

反応液6の結果を図11に、対照液6の結果を図12に示す。図12では、f-VHに由来するピーク（面積：42mABU×sec）のみが認められたが、図11では、f-VHのピークが減少（面積：36mABU×sec）し、新たに反応生成物のピーク（面積：4mABU×sec）が認められた。さらに、この反応液にVHを少量添加し、再度キャピラリー電気泳動でピークの増減を確認したところ、反応生成物とVHのピークが一致したことから、反応生成物はVHであることが確認できた。

この結果から、ブドウ科植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。

#### 実施例6

##### フルクトシルペプチドの脱フルクトシル化方法

##### （セリ科植物由来脱フルクトシル化酵素の使用）

実施例3で得られた粗精製酵素については、実施例5と同様の条件下で試験を行った（反応液7）。

反応液7の結果を図13に示す。対照液の結果は、上記の図12で兼用した。図12では、f-VHに由来するピーク（面積：42mABU×sec）のみが認められているが、図13では、f-VHのピークが減少（面積：16mABU×sec）し、新たに反応生成物のピーク（面積：16mABU×sec）が認められた。さらに、この反応液にVHを少量添加し、再度キャピラリー電気泳動でピークの増減を確認したところ、反応生成物とVHのピークが一致したことから、反応生成物はVHであることが確認できた。

この結果から、セリ科植物由来脱フルクトシル化酵素を使用することにより、

フルクトシルペプチドから脱フルクトシル化することができることが分かった。



## 請求の範囲

1. フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に、植物から抽出された脱フルクトシル作用を有する酵素を作用させることを特徴とする脱フルクトシル化方法。

2. 植物から抽出された脱フルクトシル作用を有する酵素が、バラ科、ブドウ科又はセリ科に属する植物から抽出されたものである請求項1記載の脱フルクトシル化方法。

3. フルクトシル化されているペプチドのアミノ酸配列が、配列番号1～5のいずれかで表されるものである請求項1又は2記載の脱フルクトシル化方法。

4. フルクトシル化されているタンパク質が、ヘモグロビンA1cである請求項1～3のいずれか1項記載の脱フルクトシル化方法。

5. フルクトシル化されているペプチド又はタンパク質に対して、脱フルクトシル作用を有する酵素であって、植物由来である酵素。

6. 植物が、バラ科、ブドウ科又はセリ科に属する植物である請求項5記載の酵素。

7. 請求項1～4のいずれか1項記載の脱フルクトシル化方法により得られた反応生成物の1種又は2種以上を測定することを特徴とするフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法。

8. 脱フルクトシル化方法により得られた反応生成物が、過酸化水素、グルコソン、グルコース及び脱フルクトシルペプチドである請求項7記載のフルクトシル化されているペプチド又はタンパク質の測定方法。

図 1

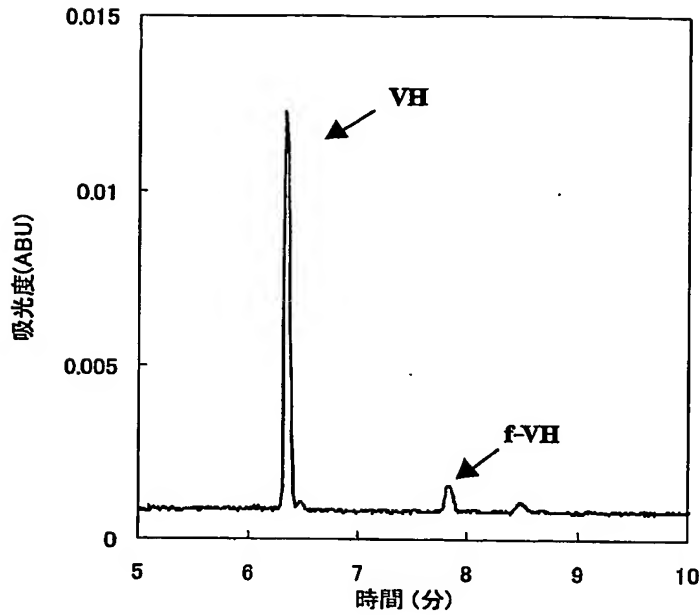


図 2

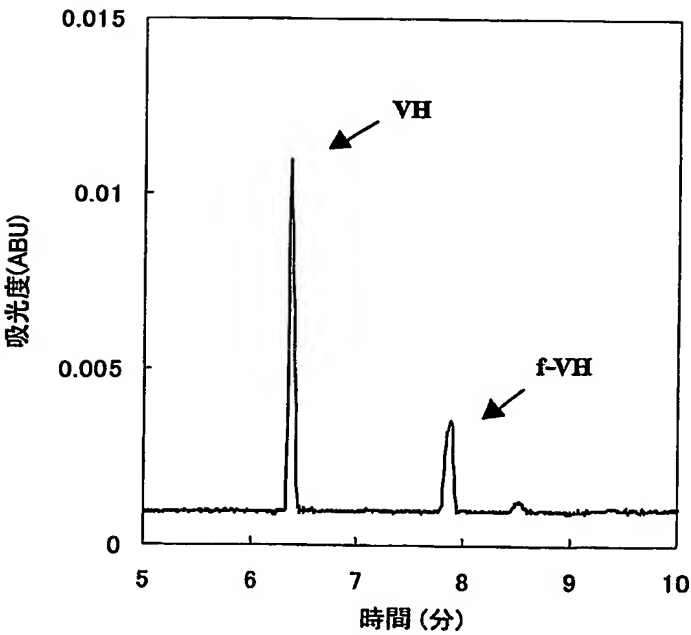


図 3

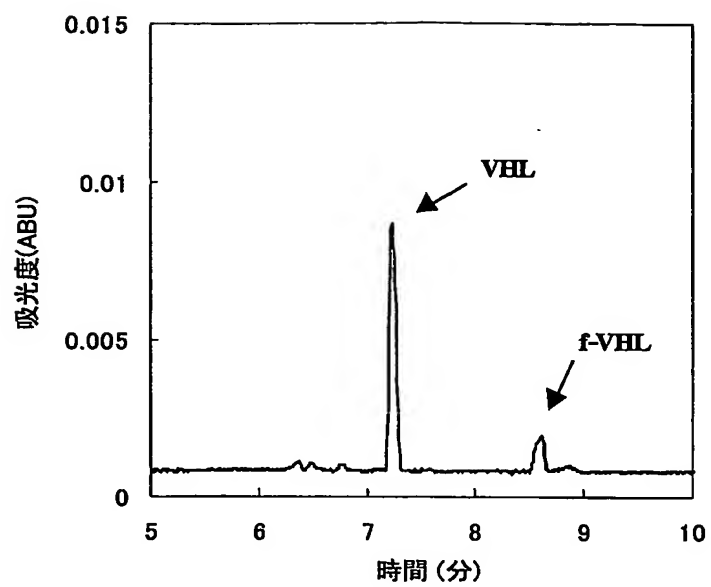


図 4

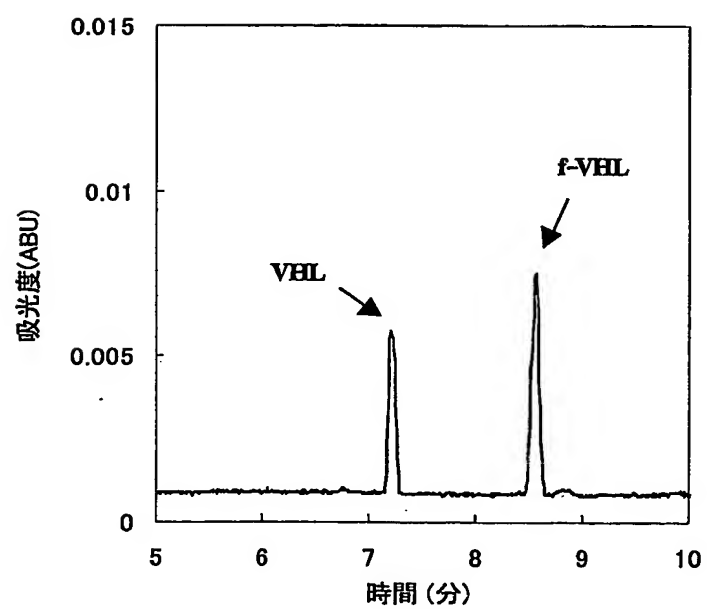


図 5

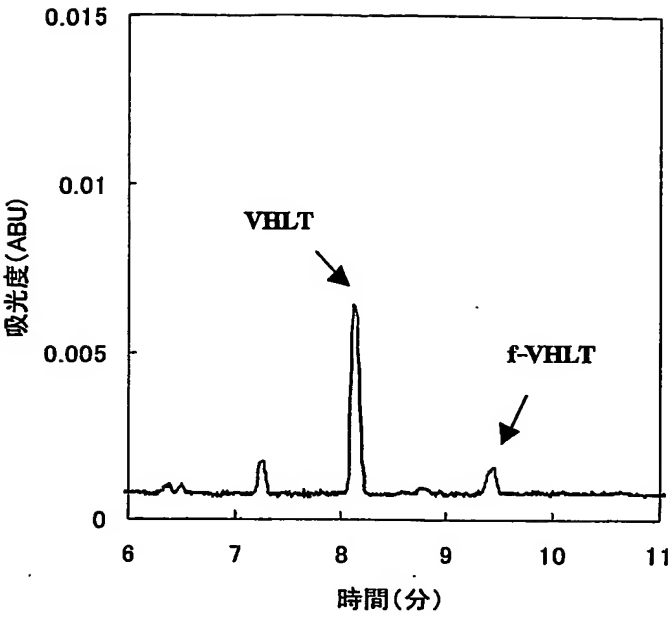


図 6

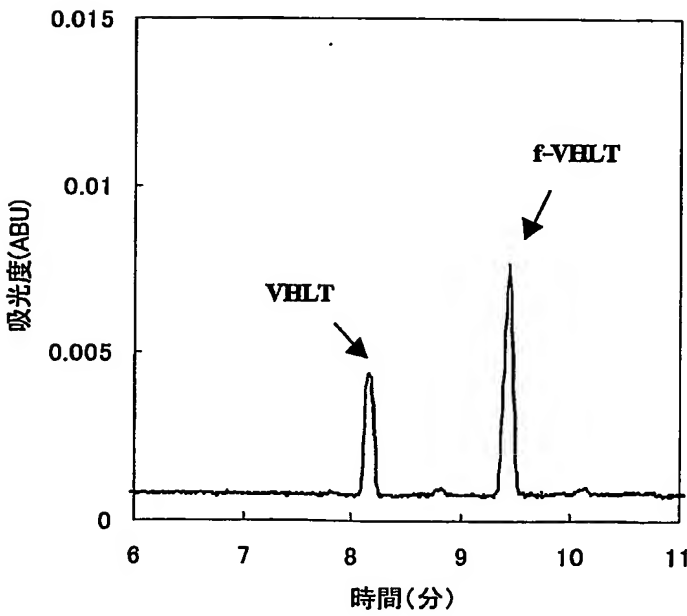


図 7

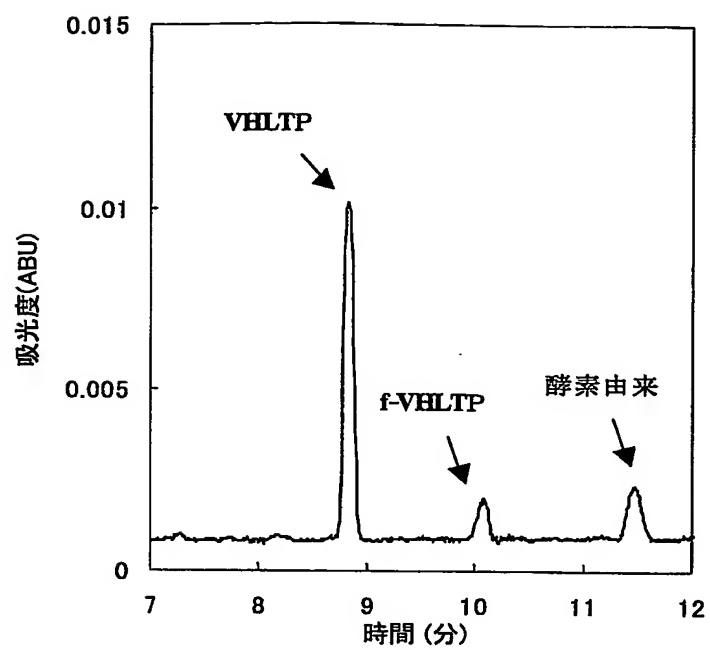


図 8

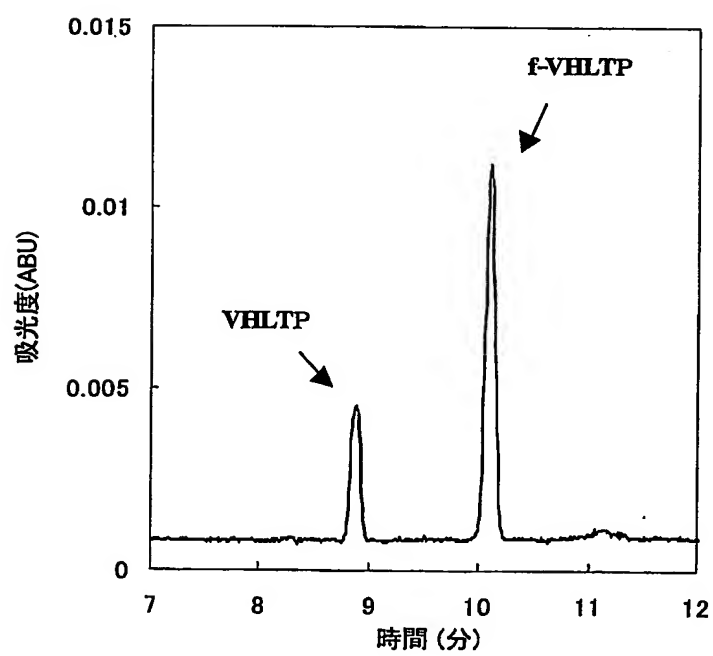


図 9

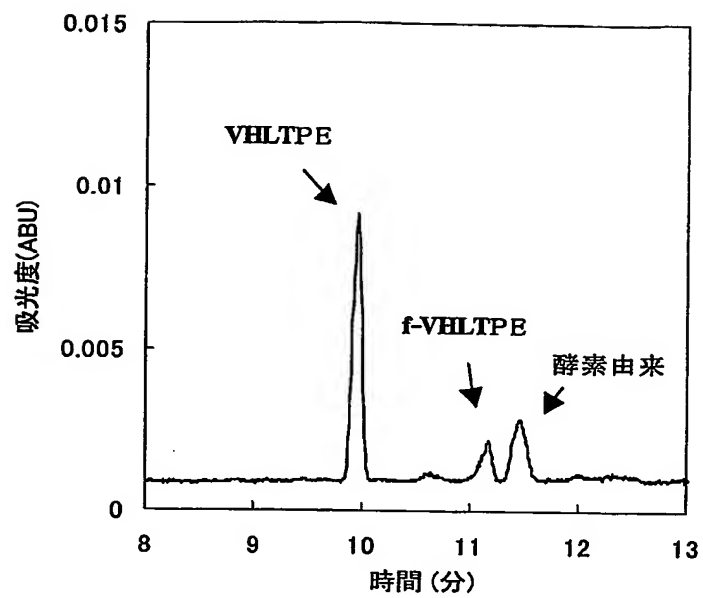


図 10

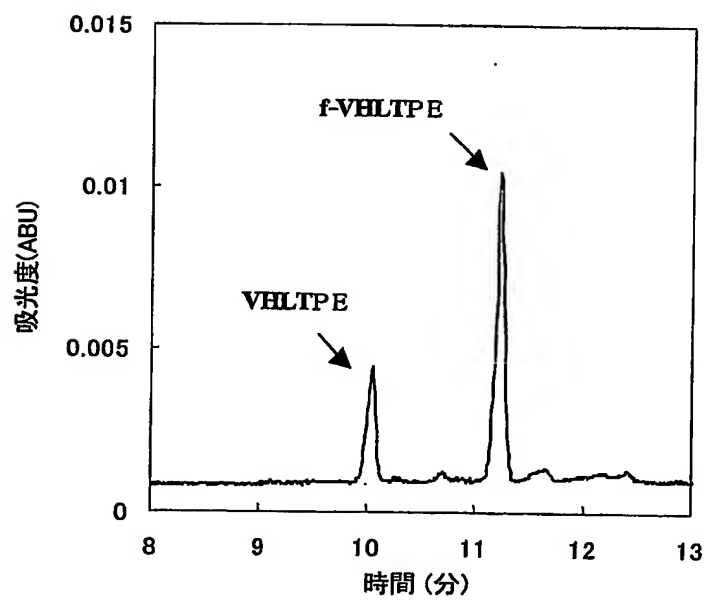


図 1 1

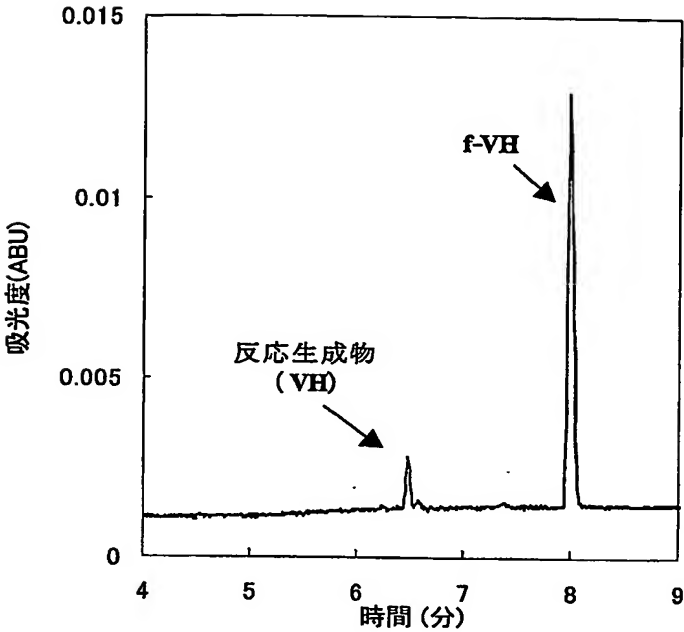


図 1 2

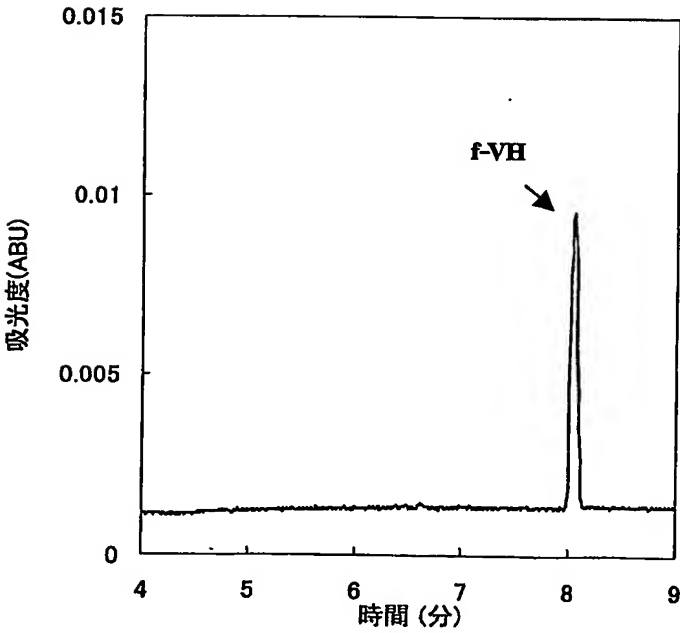
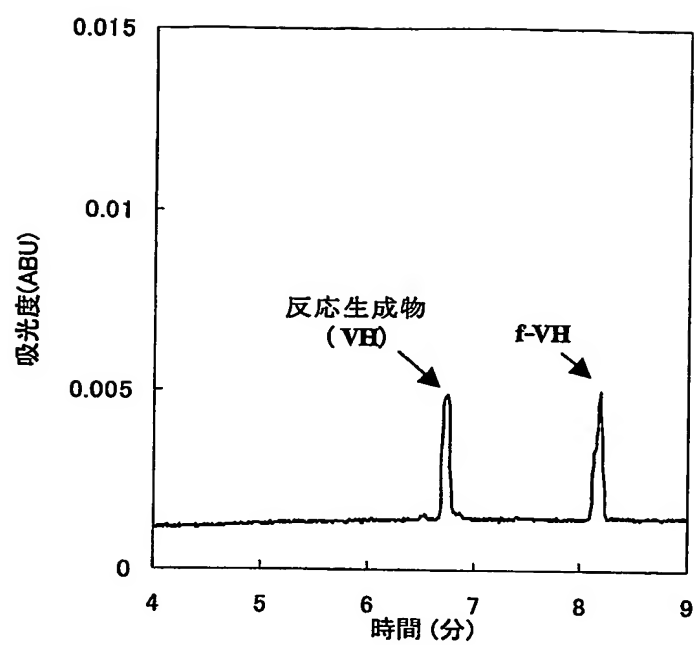


図 13







# SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.

<120> Defructosylation Method

<130> DC0045

<150> JP 2002-308731

<151> 2002-10-23

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Val His

1



<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Val His Leu

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Val His Leu Thr

1

<210> 4

<211> 5

<212> PRT



<213> Human

<400> 4

Val His Leu Thr Pro

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Val His Leu Thr Pro Glu

1 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13547

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/02, C12N9/24, C12Q1/34, G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/02, C12N9/24, C12Q1/34, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-54398 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 27 February, 2001 (27.02.01), (Family: none)	1-8
A	JP 11-155579 A (Kikkoman Corp.), 15 June, 1999 (15.06.99), (Family: none)	1-8
A	JP 2001-955598 A (Kikkoman Corp.), 10 April, 2001 (10.04.01), & WO 01/245475 A1	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 December, 2003 (08.12.03)

Date of mailing of the international search report  
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P21/02, C12N9/24, C12Q1/34, G01N33/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P21/02, C12N9/24, C12Q1/34, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-54398 A (旭化成工業株式会社) 2001.02.27 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 11-155579 A (キッコーマン株式会社) 1999.06.15 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2001-955598 A (キッコーマン株式会社) 2001.04.10 & WO 01/245475 A1	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

印

4B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488